

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 05240748 A

(43) Date of publication of application: 17.09.1993

(51) Int. Cl. G01N 1/00

G01N 1/12, G01N 1/30, G01N 33/48, G01N 33/50, G01N 33/543

(21) Application number: 04236067

(22) Date of filing: 03.09.1992

(30) Priority: 13.09.1985 US 85 775864

(62) Division of application: 61215578

(71) Applicant: FISHER SCIENT CO

(72) Inventor: BRIGATI DAVID J

(54) METHOD FOR TREATING THIN PIECE
SAMPLE ON SURFACE BY CAPILLARY FLOW

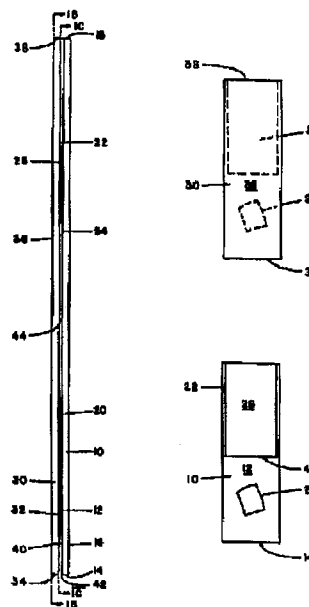
excluded from the gap 40, and the pair can be transferred to next treating liquid operation.

COPYRIGHT: (C)1993,JPO

(57) Abstract:

PURPOSE: To treat various treating liquids at many stages by drawing a first treating liquid to the position of the sample fixed by capillary flow between a sample holding surface and an opposed surface bringing it into contact with the sample, holding it, and similarly drawing a second treating liquid after excluding it.

CONSTITUTION: A microscope slide 10 for holding a sample has a sample holding front surface 12, a first lower edge 14, a rear surface 16 and an upper edge 18. A thin piece sample 20 is provided at the lower part of the surface 12. The adhesive surface 24 of a shim 22 is adhered to the upper part of the front surface of the slide 10, and the opposite side adhesive surface 26 is adhered to the opposed surface 32 of the slide 30 of the opposed element. A capillary gap 40 is formed between the surfaces 12 and 32. The slide pair hold the liquid received from the droplet in contact with the lower air gap by capillarity, in contact with the sample 20, remains in the gap 40 for an arbitrary time, and when the slide pair drop on absorbing material. The liquid is absorbed into the material to be completely



(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-240748

(43)公開日 平成5年(1993)9月17日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 1/00	1 0 1 M	8105-2 J		
1/12	B	7519-2 J		
1/30		8105-2 J		
33/48	P	7055-2 J		
33/50	P	7055-2 J		

審査請求 未請求 発明の数 1 (全 18 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平4-236067	(71)出願人	391011294
(62)分割の表示	特願昭61-215578の分割		フィッシャー・サイエンティフィック・カンパニー
(22)出願日	昭和61年(1986)9月12日		F I S H E R S C I E N T I F I C C O M P A N Y
(31)優先権主張番号	7 7 5 8 6 4		アメリカ合衆国ペンシルバニア州 15219,
(32)優先日	1985年9月13日		ピッツバーグ, フォーブス・アベニュー
(33)優先権主張国	米国 (U S)		711
		(72)発明者	デービッド・ジョン・ブリゲイチ
			アメリカ合衆国ペンシルバニア州17036,
			ハメルスタウン, ジュリアンヌ・ドライブ
			1213
		(74)代理人	弁理士 湯浅 恭三 (外3名)

(54)【発明の名称】 表面上の薄片試料を毛管流により処理するための方法

(57)【要約】

【構成】 第1表面上の薄片試料を一連の処理液で処理するための方法であって、

- a) 第1処理液を試料保有第1表面と対面要素の第2表面との間隙内の毛管流により、少なくとも試料保有第1表面上に固定化された試料の位置にまで引込み、
- b) 第1処理液を間隙内で毛管作用により試料と接触した状態に保持し、
- c) 第1処理液を毛管流により間隙から排除し、そして
- d) 第2処理液を間隙内の毛管流により少なくとも試料の位置にまで引込む工程からなる方法。

【効果】 薄い試料又は平面上に固定化された材料を種々の処理液で多段階処理することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 第1表面上の薄片試料を一連の処理液で処理するための方法であって、

a) 第1処理液を試料保有第1表面と対面要素の第2表面との間隙内の毛管流により、少なくとも試料保有第1表面上に固定化された試料の位置にまで引込み、

b) 第1処理液を間隙内で毛管作用により試料と接触した状態に保持し、

c) 第1処理液を毛管流により間隙から排除し、そして

d) 第2処理液を間隙内の毛管流により少なくとも試料の位置にまで引込む工程からなる方法。

【請求項2】 平らな試料保有表面が顕微鏡スライドの表面である、請求項1記載の方法。

【請求項3】 第1表面および第2表面が引込み工程

(a) および (b) ならびに排除工程 (c) に際して垂直に広がる方向に維持される、請求項1または2記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は適切な平面、たとえば顕微鏡スライド上に固定化された組織学的、細胞学的、または血液学的検体などの試料を (1) 化学的染色液、あるいは (2) 溶存試薬、たとえば (a) 抗体または (b) 標識されたDNAもしくはRNAプローブなど、それぞれ固定化された試料中に存在する抗原または核酸配列の検出に用いられる試薬で処理するための方法に關する。

【0002】 現在の組織学、細胞学および血液学の技術においては、大部分の臨床実験室または研究室で実験助手が実施するのに長時間を必要とする手動による染色法が用いられている。これらの方法は、大量のスライドを1人の実験助手が1回の染色作業で同時に染色しうるので、通常は価格上は効果的である。現在用いられている手動および自動双方の染色システムとも、各スライドの一平面上に組織または細胞スミアが固定化された平行なスライドを含むホルダーを順次、同系列の液体試薬、たとえば水性試薬または染料もしくは着色剤の有機溶液中にルーテインまたはプログラミングされた様式で浸漬する。組織学、細胞学および血液学的検体についての手動染色システムの例は組織病理学および細胞病理学の専門家には周知であり、それらの実施に関するプロトコールは固定化された検体について染色を行う実験室にはいずれにも見出される。自動化されたシステムの例にはテクニコン・インスツルメンツ・シャンドン・サウザーンおよびフィッシャーサイエンティフィックにより販売されるものが含まれる【フィッシャー・ヒストマチック (Histomatic, 登録商標) スライド・ステイナー 172型の説明に関してはフィッシャー86カタログ426-427頁を参照されたい)】。

【0003】 毛管作用は大量自動化スライド染色法を開

発することを試みた下記の先行技術において採用された。米国特許4,199,613号明細書(ジョンソン,1980年)には、積重ねられた平行なスライドを両端付近で一連の一般に平行なシムによりかみ合わせたシステムが記載されている。これらのシムは平行に積重ねられた隣接スライドの対応する末端の間に置かれ、隣接するスライドの向かい合った平面にシムの厚さだけ間隔を置く。この厚さ(たとえば0.008インチ、0.2mm)は、隣接するこれらの対向平面間に毛管流に適した空間を与える。使用に際しては、一組のスライド(たとえば50枚)を垂直に積重ね、連続的な液流(たとえば染色液)をこれらのスライドの隣接末端部分上へ流し(垂直に積重ねられた最上スライドから出発する)、隣接スライド間の狭い間隙を順次充填する。充填は水平方向への毛管流による。これらの狭い間隙を充填するのに必要なものよりも過剰の液体は底部スライドから流れ去る。このシステムは多数のスライドを一連の等しい試薬で染色することを目的とし、前記の手動および自動染色法に採用されたと同じ性質のものである。

【0004】 液状検体を鏡検用空間内に捕捉する分野(この分野は固定化された試料を染色液および液状試薬で処理するのと同等とは認められない)で、毛管流がしばしば利用される。一般に米国特許第4,501,496号(グリフィン,1985年)及び第3,961,346号(ホワイト,1975年)明細書に示されるように、液体試料は底板上へ導入され、底板の鏡検面とここに乗せられた透明な平面により定められる狭い間隙内へ毛管流によって移行する。しかし米国特許第4,308,028号明細書(エルキンス,1981年)においては、ストリップと呼ばれる装置が試験管内の試料(たとえば遠心分離された尿試料)中へ垂直に伸びた状態で浸漬される。4欄53行ないし5欄14行(エルキンスの図6および7を参照されたい)に記載されるように、試料の底部面分からの、粒子に富むアリコートが毛管作用によりチャンパー(エルキンスの各図面において14と表わされる)内へ流入する。エルキンスの明細書中の他の箇所に、多層の積層によるストリップの構成(1中間層は短く、一定の厚さをもち、他の少なくとも1層は長く、透明である)が記載されている(7欄3~45行)。この方法の最後に、ほぼ一定の厚さのチャンパー14内の試料をエルキンスの図22に示されるように未染色、未処理の状態、短い中間層の末端を越えて広がる長い透明な層の一部を通して鏡検する。

【0005】 本明細書に添付した図面につき簡単に説明する。

【0006】 図1Aは第1の形態によるスライドアセンブリーの側方立面図である。

【0007】 図1Bは図1Aの線1B-1Bに沿って得た前方立面図である。

【0008】 図1Cは図1Aの線1C-1Cに沿って切

断して得た前方立面図である。

【0009】図2Aは第2の形態によるスライド対を分解した状態の側方立面図である。

【0010】図2Bは図2と同じスライド対をホルダー部分内で組立ててスライドアセンブリーを構成した状態の、図2と同じ立面図である。

【0011】図2Cは図2Bの線2C-2Cに沿って切断して得た、ホルダー内のスライドアセンブリーの上面図である。

【0012】図2Dは第3の形態によるスライドアセンブリーの分解した状態を示す、図2Bと同様な図である。

【0013】図2Eはホルダー内に入れられた図2Dのスライドアセンブリーの、図2Bと同様な図である。

【0014】図3Aは、液滴保持器の上方に置かれた、それぞれ第2の形態によるスライドアセンブリーの配列を、図3Bの線3A-3Aに沿って切断して得た側方立面図である。

【0015】図3Bは図3Aの線3B-3Bに沿って得た、図3Aに断面で示した液滴保持器の平面図である。

【0016】図3Cは図3Aと同じ角度からみた、液滴1個に接触している1個のスライドアセンブリーの拡大図であり、液体が本発明方法に従い毛管流によって狭い間隙内へ垂直方向に引込まれる状態を示す。

【0017】図3Dは液体が毛管流によって狭い間隙から吸収材料中へ垂直方向に引込まれる状態を示す、図3Cと同様な図である。

【0018】図4は第4の形態によるスライドアセンブリーを示す、図1Cと同様な前方立面図(断面)である。

【0019】図5は一部スライド対が装填された、第5の形態によるスライドホルダーの倒立した状態を示す透視図であり、配列が5対のスライド5列ではなく10対のスライド3列であるという点のみにおいて図2A、2B、3A、3B、3Cおよび3Dに示した形態と異なる。

【0020】図6は図5のスライド対配列を用いた手動または自動多段階法用のステーションの配列を示す平面図である。

【0021】図7は図5および図6の形態による液滴保持器が一部装填された状態を示す透視図である。

【0022】本発明により提供される多様な方法によって、高価な液体を控え目に使用でき、同時に処理される試料または材料の処理液の変更に際し融通性があり、試料間の相互汚染が最小限に抑えられ、有毒な試薬が実験室職員に接触するのが防止されるという点で安全であり、あるいはこれらの要素を合わせもつという利点をもって、薄い試料または平面上に固定化された材料を多段階処理することが可能になる。本方法においては、固定化された試料を含む表面の前方に狭い毛管間隙を採用す

ることにより(特に間隙が垂直方向に広がる場合)、この間隙の一縁を、特にこの垂直方向に広がる間隙の基底部において、分離されたアリコートの処理液と接触させることにより、または次いでこの間隙の一縁(特に垂直方向に広がる間隙の底縁)を吸収材料と接触させることによって液体を排除することにより、あるいはこれらの特色の組合せにより、上記の利点が達成される。このような特色は米国特許第4,199,613号明細書に記載の方法にまさる特別な利点を与える。後者の方法は個々のスライドを独自の試薬で同時に処理することができず、この方法は対照的に水平方向に広がる間隙、連続液流での液体の導入、およびスライドアセンブリー全体を回転させることによる液体の排除を採用している。

【0023】本発明は多数のスライドが単純配列の液体試薬に系統的に暴露される大量染色に採用できるが、個々のスライドに独自の系列の試薬が同時に施される別個の分析器として用いられる場合、先行技術にまさる特別な利点をもつ。

【0024】従って本発明は、第1表面上の薄片試料を一連の処理液で処理するための方法であって、

- a) 第1処理液を試料保有第1表面と対面要素の第2表面との間隙内の毛管流により、少なくとも試料保有第1表面上に固定化された試料の位置にまで引込み、
- b) 第1処理液を間隙内で毛管作用により試料と接触した状態に保持し、
- c) 第1処理液を毛管流により間隙から排除し、そして
- d) 第2処理液を間隙内の毛管流により少なくとも試料の位置にまで引込む工程からなる方法を提供する。

【0025】なお、本出願の親出願である特願昭61-215578号(特開昭62-98231号)においては、本発明と関連した下記(1)~(5)の方法又は装置が開示されている。

【0026】(1)第1表面上の薄片試料に液体を施す方法であって、

- a) 第2表面を第1表面に実質的に平行に、これから第1距離だけ間隔を置いた状態に維持し、これにより第1表面と第2表面の間に間隙を設け、そして
- b) この間隙の縁を分離されたアリコートの液体と接触させる工程からなり、上記の第1距離は、液体を間隙内で毛管作用により移動させて薄片試料と接触させるのに十分なほど小さいものである方法。

【0027】(2)

- a) 試料保有第1表面をもつ第1員子を対面要素の第2表面から一定距離に保持し、その際第1表面および第2表面が実質的に平行に維持され、これら2表面の第1縁および第2縁が平行に伸びかつ実質的に上記の第1距離だけ分離された状態となるためかみ合わせ手段、ならびに
- b) 第1縁と第2縁の間の空隙を、分離されたアリコートの液体と接触させるための接触手段、からなり、上記

の第1距離は液体が上記空隙から毛管作用により第1表面と第2表面の間を移動して試料と接触するのに十分なほど小さいものである、第1表面上の薄片試料を処理するための装置。

【0028】(3)

a) 垂直に広がる状態に配置された材料保有平面を対面要素の表面から第1距離に保持するかみ合わせ手段であって、このかみ合わせ手段が材料保有平面および向かい合った平面の各下縁が水平に伸び、かつ実質的に平行となる、向かい合った平面間の整列を維持するもの、なら

b) 材料保有平面および向かい合った平面の下縁間の空隙を液体と接触させるための接触手段からなり、材料保有平面および向かい合った平面の間の第1距離は、液体が向かい合った各平面間で毛管作用により少なくとも薄片材料の高さにまで上方へ移動するのに十分なほど小さいものである、平面上の薄片材料を処理するための装置。

【0029】上記(1)～(3)のそれぞれにおいて第2表面(すなわち対面員子の表面)は第1表面(すなわち材料保有平面)上の薄片状の試料または材料の場合と同じ処理液が接触している薄片状の試料または材料を保有してもよい。さらに(あるいは)、複数の表面対の配列を、液体が毛管作用により各表面対の間隙内へ同時に引込まれるように配置してもよい。

【0030】(4)

a) それぞれ垂直に広がる表面をもつ複数の垂直に広がるスライド、

b) それぞれ垂直に広がる表面をもつ複数の垂直に広がるカバー員子(垂直に広がるスライドの各表面は垂直に広がるカバー員子の表面から0.5mm以下の第1距離だけ間隔を置く)ならびに

c) 垂直に広がるスライドおよび垂直に広がるカバー員子をそれらの上端に近接した位置で固定した配列に保持し、その際各スライドの試料面は垂直に広がるカバー員子の実質的に平行な表面から第1距離にあり、かつ各スライドの下縁は水平に伸び、カバー員子の実質的に平行な水平に伸びる下縁から第1距離だけ間隔を置いた状態となるためのかみ合わせ手段からなり、水平に伸びる各下縁間の間隙は開放されている、スライドアセンブリの配列。

【0031】(5)

a) 水平に広がる硬質の底板、

b) 実質的に平らな水平に広がる上面をもつ水平に広がる弾性員子、および

c) 水平に広がる上面に対しそれぞれ開放されている、弾性員子に形成された複数のくぼみからなり、弾性員子はその上面に、くぼみ内の分離されたアリコートの処理液が隣接する弾性員子の上面の平面の上方へ広がる凸形を形成するのに十分なほど処理液と不相容性である材料

を含む、分離されたアリコートの処理液の水平な配列を保持するための装置。

【0032】前記のシステム、たとえばジョンソンのシステムは特定の配列の同じ試料を一組の平面(たとえば顕微鏡用スライド)に施すことはできるが、これらの先行技術によるシステムは個々のスライドを独自の試薬で同時に処理しうる融通性をもたない。さらにスライドを浸漬するのに必要な、容器内の水性または有機の染色液の体積は、組織もしくは細胞結合抗原または遺伝子配列のより複雑な分析の特異的工程を、それぞれ抗体指向検出法または核酸ハイブリッド形成法により経済的に実施するためには大きすぎる。この種の特異的工程を伴う多工程法はいずれも、先行技術によれば、他の工程を実施し、スライド配列を分解して特異的工程を手動で実施し、次いでスライド配列を再度組立てて後続の工程を自動的に実施することによって初めて自動化することができる。このような分解/再組立ては、この種の複雑な分析に関する自動化の利点を損う。従って、個々のスライド上に固定化された別個の組織または細胞スミアに関する多数の別個の分析を同時に、高価な抗体または核酸プローブをわずかにマイクロリットルの量用いて行われる手動法または自動法が求められており、これが本発明により満たされた。

【0033】本方法は、現在個々の手動操作により別個の抗原情報または遺伝情報の分析を行っている臨床実験室または研究室の双方に広く利用されるであろう。

【0034】スライド対アセンブリの第1の形態を図1A、1B、および1Cに示す。図1Aについて述べると、試料を保有する顕微鏡スライド10は試料保有用前面12、第1下縁14、裏面16、および上縁18をもつ。薄片試料20(たとえば5~10μmの厚さの組織学的検体)が前面12の下部に施されている。スライドが高さ7.5mm、幅25mm、厚さ1mmであるとする(顕微鏡スライドについての標準的寸法)、試料は第1下縁14の上方少なくとも1.0mm(たとえば1.0mm)の位置にあって、20mm×20mm平方でありうる。

【0035】第1スライド10の前面12の上方に付着してシム22があり、これはこの第1の形態では厚さ0.2mm(200μm)の両面接着テープとして示されている。シム22の一方の粘着面24が第1スライド10の前面の上部に付着する。シム22の反対側の粘着面26は対面要素すなわちスライド30の対向面32に付着する。この形態においては、対面スライド30も7.5mm×25mm×1mmの顕微鏡用スライドである。シム22は対面スライド30を第1スライド10と整列させた状態に保ち、これにより対面スライドの対向平面32は前面12に平行であり、かつこれからシム22の厚さ(200μm)だけ間隔を置き、対面スライド30の第2下縁34は第1スライド10の第1下縁14と同

一平面上にあり、対面スライド30の裏面36は表面32、12および16と平行であり、対面スライド30の上縁は第1スライド10の上縁18と同一平面上にある。

【0036】200 μ mという距離は、上縁18と38の内縁から前面12および対向面32の垂直方向の長さに沿って、第1および第2下縁14および34の内縁まで、実質的に一定である。テープが高さ25mmであるとする(その幅はスライド10および30の幅25mm全体であってもよく、あるいは図示されるようにより短く、例えば22mmであってもよい)、前面12と対向面32の間に間隙40が形成される。この間隙40(高さ50mm、幅25mm、厚さ0.2mm(200 μ m))は下端42で終わる毛管間隙である。試料20はわずか5~10 μ mの厚さであり、試料20の高さの位置においてすら、間隙40の厚さに対し有意の影響をもたない。同様に他の欠陥、閉じ込められた粒子、2枚のスライドが平行からずれた方向に向くこと、その他間隙40に20%以下の影響を与える因子(すなわち200 μ mの厚さの間隙を160~240 μ mの厚さにするもの)は不利な影響をもたず、これよりもわずかに大きな変動ですら有意に不利な影響はもたないであろう。さらに、この第1の形態の場合、間隙の基本的なまたは平均的な厚さは0.2mm(200 μ m)であるが、0.05mm(50 μ m)程度の小さな間隙、または0.5mm(500 μ m)程度の大きな間隙も、図4に関連して以下に述べるように調整された他の寸法(たとえば高さ)と共に許容される。適宜な状況下では、なお50 μ m以下または500 μ m以上の厚さの間隙も適切であろう。

【0037】図1Bは前面から見た同一のスライド対アセンブリーを示す。対面スライド30(その裏面36が前方にある)は第1スライド10を対面スライド30の上縁38から下縁34まで完全に覆う。シム22の粘着面26が対面スライド30の上部の下に見える。試料20(試料スライド10上に固定化されている)は対面スライド30の下部の下中央に見える。図1Bに示すように垂直方向に正確に整合することは決定的なものではない。この方向に2mm(あるいは5mmすら)の不整合は、有意の不利な影響をもたない。さらに上記のように、各幅がすべて等しい(たとえば25mm)必要はない。

【0038】図1Cは図1Bと同じ前面図を示すが、この場合は対面スライド30の後方が見えるような断面図である。シム22の前面26が目視できる表面の上方25mmを占めている。第1スライド10の前面12の下部50mm \times 25mm(シム22の下端44の下)がここでは目視できる。毛管間隙40に対し露出しているのはこの50mm \times 25mmである。試料20は試料保有面12のこの50mm \times 25mm部分内の中央に位置

する10 \times 10mm部分を占める。間隙の高さは、シムとしてこれよりも短いかまたは長いテープ片、たとえば幅25mm、長さ(高さ)20、30、40または50mmのテープを用いることによって調整できる。

【0039】図2A、2Bおよび2Cはスライド対アセンブリーの第2の形態を示す。第1下縁14、前面12を備え、試料20を保有する第1スライド10は図1Aの対応する要素に等しい。対面スライド130も75mm \times 25mm \times 1mmの顕微鏡用スライドであり、対向面132および第2下縁134を備えているが、この場合シム122は下端144をもつ40mm \times 25mm(または22mm) \times 0.15mmのガラス製カバーリップである。シム122の40mm \times 25mmの第1面124は(図2Bにおいて隣接して組立てられた場合)、第1スライド10の前面12の上部に面する。シム122の40mm \times 25mmの第2面126は対面スライド130の対向面132の上部に接着される。

【0040】対面スライド130の裏面136に沿って、リング、圧縮可能な薄板ばねまたはローラーもしくはソリッドディスク状の上部および下部エラストマープロデュバランス146および148が施され、これらは勾配付き上部(図示されていない)を備えていてもよい。

【0041】図2Bにおいては、図2Aのスライド対がスライド10と130を互いに平行に配置し、それらの上端をホルダー150内に形成された高さ30mm、幅26mm、厚さ2.4mmの寸法のくぼみに滑り込ませることにより組立てられている。このくぼみは下方へ開き、その頂部に垂直方向に広がる整合面156をもつ。第1スライド10および対面要素130の上縁18および138は整合面156に隣接する。プロデュバランス146および148は、ホルダー150に形成されたくぼみの裏壁内に垂直方向に広がる下開きスロット152内にかみ合わせられ、これにより対面要素130の上部およびシム122全体を第1スライド10の上部に押しつける。このかみ合わせ手段の組合わせによって、第スライド10および対面スライド130が平行に、シム122の厚さ(0.15mm)、スライド10および130の幅(25mm)、ならびにシム122により覆われていない高さ(35mm)の間隙をもって整合される。下縁14と134は同一の高さにあり、互いにシムの厚さ(すなわち0.15mm)と実質的に等しい距離だけの間隙を保つ。

【0042】図2Cは図2Bの線2C-2Cに沿って得た図2Bの上面図である。この断面図においては、プロデュバランス148がスライドホルダー150内にくぼみ内の下開きスロットとして切込まれたスロット152の内側に見える。プロデュバランス148はスロット152に押付けられ、対面要素130の反対側に接着されたシム122を圧迫する。これによって、ホルダー15

0により適所に保持された第1スライド10の上部に圧力が与えられる。こうして対面スライド130と第1スライド10の上部が接触状態に保たれ、下方へ垂直に懸垂される。スロット152は下方へ開くので、対面スライド130および第1スライド10はスロット152がプロチュパランス146および148に与える案内作用によって、容易にホルダー150に挿入し、これから取出すことができる。

【0043】図2Dおよび2Eは第3の形態であり、プロチュパランス146' および148' がこの場合、対面要素130の裏面136上ではなくホルダー150' 内のくぼみの内側に配置されるという点で図2Aの場合と異なる。

【0044】図2Dについて述べると、試料保有用の顕微鏡スライド10は第2の試料保持用の顕微鏡スライド130' およびその試料保有面132' に面した試料保有前面12をもつ。試料保有用の顕微鏡スライド10上の薄片試料20は対向する試料保有スライド130' 上の試料120' の反対側に存在する。

【0045】図2Eについて述べると、試料保有スライド10および130' はそれらの上部に押しつけられたエラストマープロチュパランス146' および148' の圧力によってホルダー150' 内のくぼみの適所に保持されている。シム122' はそれらの上部にはさまれている。第2の試料保有スライド130' の試料保有面132' 上に固定化された試料120' は、適所に保持された各試料保有面が近接並置されることにより生じた間隙内に、試料40からみて間隙40を横切って反対側に、シム122' に対するプロチュパランス146' および148' ならびに2枚の試料保有スライド10および130' の上部にあるホルダーの圧力により保持される。

【0046】図3Aおよび3Bはスライド25対の配列を整列させ、使用する方式を示す。図3Aには、スライド5対1列が示されている。各対の第1スライド(10a, 10b, 10c, 10dおよび10e)はシムによって第2すなわち対面スライド(230a, 230b, 230c, 230dおよび230e)から一定の距離を置く。垂直方向の整列はホルダー250の底面に形成された5個のくぼみの上縁(256a, 256b, 256c, 256dおよび256e)により維持される。

【0047】こうしてシムの厚さをもつ垂直に広がる間隙が図2Aおよび2Bに関連して先きに示したように形成され、これらはそれぞれ第1スライドおよび対面スライド10a/230a, 10b/230b, 10c/230c, 10d/230dおよび10e/230eの整合した第1下縁と第2下縁の間の下部空隙42a, 42b, 42c, 42dおよび42eにおいて終結する。下縁のすべての組は共通の水平面にあつて、ホルダー250の下面の下方一定の距離にある。

【0048】液滴保持器はこの水平面の下方に位置し、硬質の支持体62および水平に広がる弾性員子64からなる。図3Aに示すように、5個の孔66a~66eが弾性員子64内に形成され、これらの孔はそれぞれ一定容積(たとえば $150\mu\text{l}$)の分離したアリコートすなわち液滴68a~68eで満たされる。のちにより詳細に述べるように、各液滴68a~68eは弾性員子64の上面から突出している。スライドホルダー250が下降すると、下部空隙42a~42eにそれぞれ液滴66a~66eが接触するように整合される。液滴は普通は上方から(たとえばマイクロピペット装置により)導入されるが、硬質の支持体62に形成された狭い通路によって下方から導入することもできる。同様な液滴保持器が図7に示されている。

【0049】図3Bには、2列の液滴5組68a~68yおよび69a~69yを含む弾性員子64が示されている。スライド10a~10eおよび対面スライド230a~230eの断面を見ると、これらが液滴68a~68eおよび69a~69eに接触することが認められる(たとえば下部空隙42aは下部空隙42aの2末端付近の液滴68aおよび69aと接触するであろう)。

【0050】1列のスライド対10a/230a~10e/230eが液滴68a~68eおよび69a~69eに接触するのに伴って、5対のスライドのうちの他の4列それぞれを、それぞれ2)液滴68f~68jおよび69f~69j、3)液滴68k~68oおよび69k~68o、4)68p~68tおよび69p~69t、ならびに5)68u~68yおよび69u~69yに接触するように整合させることができる。第1スライド、対面スライド、従って下部空隙はすべて共通の水平面内に正確に整合して保持され、弾性員子64は液滴の配列全体を共通の水平面内に正確に整合させて保持するので、それぞれ第1スライドおよび対面スライドの第1下縁と第2下縁の間の下部空隙それぞれを再現性をもって液滴2個に接触させることが可能である。さらにのちに述べるように、液滴68a~68yと69a~69yが分離されていることにより、各第1スライド上の試料を施される処理液に関してそれぞれ他の第1スライドと同様に、あるいは異なって処理する融通性が得られる。

【0051】次いで図3Cには、孔66a中の液滴が接触する空隙42a(スライド10aおよび230aの第1下縁14aと第2下縁234aの間)の効果が示される。液体の毛管70aは毛管作用により毛管間隙240(図1Aの間隙と同じ)中を上昇する。この作用は液体と弾性員子64の表面との相対的な不相容性によって高められる。たとえば水性液滴は弾性員子64の疎水性表面によって撥水される。またこのような不相容性(員子64に用いられる弾性材料の平面上に置かれた場合、処理液がビーズ状となることにより証明される)によつて、液滴が員子64の上面の上方に立ち上がる。

【0052】毛管70aが毛管作用の及ぶ限り上昇したのち(上記の0.15mmの間隙において一般に約30~40mm)、スライドアセンブリーをホルダー250により弾性員子64から離して持ち上げることができる。各スライド対(たとえば10a/230a)はその下部空隙(たとえば42a)が接触していた液滴(たとえば68aおよび69a)から受け取った処理液を毛管作用により保持するであろう。液体が間隙内に任意の時間滞留したのち、スライドアセンブリーを次いで図3Dに示すように吸収材料72上へ下降させる。液体はスライド10aおよび230aの表面よりも吸収材料72の方とより相容性であるため、ここで毛管70aは下降し、処理液は下側および外側へ液体前面74aとして吸収材72内へ広がる。数秒以内に、恐らく試料に、あるいはスライド間隙240または下縁14a、234aに付着している可能性のある少量を除いて、スライド対はこの毛管作用により本質的に完全に液体が排除されるであろう。液体がスライド間隙240から排除されると、スライド対を次の工程のために他の液滴保持器に、または処理液のシートもしくは浴に移動させることができ

る。

【0053】図4は図1Cの場合と同様に、1枚の75mm×25mmのスライド上に3個の垂直に広がる試料保有面が形成された形態を示す。スライドはその75mmの下縁314を水平にして広がる。高さ25mm、幅2mmおよび厚さ0.25mmの2枚の外側シムが前面(75mm×25mm)上に垂直に広がる。2枚の内側シム322'は同様に25mm×2mm×0.25mmの寸法をもち、外側シムから等しい間隔を置き、これらに平行である。これらのシム322および322'は熱硬化性材料(たとえばエポキシまたはシリコン)をガラススライドの表面に施すことにより形成できる。従って被覆されていない隔離された面は312a、312bおよび312cであり、それぞれ下縁314から上方へ25mm広がり、幅がそれぞれ約22.33mmである。対面スライドをこの第1スライド上に乗せ、これにより厚さ0.25mm、高さ25mmおよび幅22.33mmの間隙が面312a、312bおよび312c上に形成されるであろう。下縁314に隣接したこれらの面それぞれの下部空隙を処理液に接触させ、次いで吸収材料に接触させることにより、液体試薬を前記のようにそれぞれの間隙に引込み、かつここから排出することができる。この種のスライド対を手動により液滴に施し、あるいは処理液の浴またはシートに施すことができる。

【0054】あるいは、それぞれ3個の垂直に広がる毛管間隙を備えた一連のこの種の水平に広がるスライド対を、たとえば米国特許第4,199,613号明細書(ジョンソン)の図1に示すスライドラックを用いて、各試料保有スライドの下縁314が処理液の液滴またはシートと接触しうる状態にしておくのに必要な変更を行

って、ホルダー内に保持しておくことができる。この形態の場合、ジョンソンの“シム”は試料スライドとその相手の対面スライドの間に配置されてこれらの間に毛管間隙を形成するのではなく、むしろ対面スライドおよび試料保有スライドの横両端および外表上に位置し、対面スライドおよび試料保有スライドを前記のシム322に押しつけることによりこれらを互いに押しつける。この形態においては、図4のシム322および322'は対面スライドと試料保有スライドの間の毛管間隙の第1距離を定める唯一の部品であろう。

【0055】次いでホルダー内のくぼみの側壁の厚さが対面スライドと試料保持スライドの平行な各対を分離する第2の距離を定めるであろう。この第2の距離は毛管作用のために設定されたものではなく、各組のスライド対を分離し、これにより図3Aおよび3Bに示すように液体試薬が分離された液滴から毛管間隙を通してこれらへ引込まれるためのものである。この第2の距離は2mm以上のいかなる厚さであってもよく、これはジョンソンのシムの200ミクロンまたは本発明のシムよりも著しく厚い。この第2の距離、従ってスライドホルダー内の下開き式のスライド用くぼみの縁を形成する側壁の好ましい厚さは、5~7mmである。この範囲を採用すると、最大数のスライドを隣接スライド対間に毛管間隙から液体試薬を引上げ、インキュベートし、そして排除する目的で、スライドホルダー内へはめ込むことができる。

【0056】この第2の距離範囲により図3A中の隣接毛管間隙、たとえば42aおよび42bを7~9mm離れた状態に維持することができる。この距離では、液滴保持器中の個々の液滴、たとえば68aおよび68bと69aおよび69b(図3)を、弾性員子64の表面と液滴保持具中の個々の液滴との不相容性が不注意に克服されて相互に混入することなしに、離しておくことができる。このような利点はジョンソンのスライドラックによっては不可能であろう。その場合、200ミクロンは液滴保持器上の隣接する試薬液滴を安定に分離しておくためには近すぎる。従ってジョンソンのスライドラックは、本発明の利点を達成するためにはそのものの記述から完全にかつ本質的に修正されなければならないであろう。

【0057】液体を下縁314から15~20mm上方へ上げるためには、間隙(シム322および322'の厚さ)は最初の各形態(それらの場合、液体は下縁14の上方へ25~45mm上昇することを意図する)において最も好ましい0.15~0.20mmの厚さよりも大きくてよい。ルーテイン実験により、試料保有スライド面に対し液体を目的とする高さまで垂直に上昇させるために、間隙を調整することができる。

【0058】図5は第5の形態によるスライド対で一部充填されたホルダーを示す。これはスライド5対の5列

ではなくスライド10対の3列を供給するという点で、特に図3Aおよび3Bに示した第2の形態と異なる。

【0059】図5に示したスライドホルダーの本体450は、後記のようにその下面にスライド対アセンブリを受容するために形成された一連のスロットを備えている矩形の立体状である。

【0060】あるいは、下面に形成された一連のスロットがたとえばジョンソンの米国特許第4,199,613号明細書、図1のスライドラック（その場合、“シム”は有意により厚く、スライド対アセンブリを分離するために用いられ、毛管作用を生じるために用いられるのではない）の実質的な変形を採用してコラプシブルであり、スライド対アセンブリの上部に締めつけられるホルダー内にスライド対を保持してもよい。

【0061】図5においてスライドホルダーはスライド対の挿入のためその使用時の配置と比較して逆転しているので、この下面が上部に現われている。以下の記述においては、使用時の相対配置（たとえば下面のスロット）を記述する。

【0062】プレート451は本体450の上方に（フランジとして）両水平方向にあり、これにより本体450の矩形の断面積よりも大きな矩形の断面積を覆う。アーム476はプレート451の一方側から垂直に上方へ伸び、傾斜した部分2か所478および480をもつ。同様なアーム476（傾斜した部分478および480をもつ）がプレート451の反対側から垂直に上方へ伸びているが、視野から隠されている。水平な棒482がこれら2本のアーム476を結びつけている。本体450の下面に10個の長いスロットが形成され、それぞれ垂直に、かつ水平な棒482に対し水平方向に90°の角度で伸びている。これら10個の長いスロットはそれぞれ間仕切により3個のスロットに分割され、合計30個のスロットとなる。図5において最も近い3個のスロットは455j, 455tおよび455ddと表示され、これらのスロットはそれぞれ10個のスロットの列の近い方の末端にある。試料保有スライド10a, 10kおよび10uは3列それぞれの遠い方の末端にあるスロットから外側へ伸びた状態で示される。対面スライド430uにより示されるように、対面スライドは各試料保有スライドと共に共通のスロットに挿入される。各試料保有スライドおよび隣接する対面スライドが間隙の下端を定める。これらはそれぞれスライド10a, 10kおよび10uにつき下端442a, 442kおよび442uとして示されている。各スライド対は断面においては実質的に図2Bに示したとおりである。

【0063】試料保有スライド30枚を処理したい場合、図5に示す残りのスロット（スロット455j, 455tおよび455ddまで）を満たし、スライドホルダー全体を逆転させる。種々のスライドを監視するために、視覚的にまたは機械で読取ることができるしるしが

存在してもよく、または施してもよく（たとえば試料から離れた各スライドの艶消し部分に）、これにより処理の前後に読取ることができ、あるいは（しるしが適所に、たとえば試料の位置の真上に配置されている場合）スライドがホルダー内にある場合にも読取ることができる。さらにホルダーに番号をつけて、ホルダーから個々のスライドを取出さずにその位置づけをするのを容易にし、またスライド対アセンブリが相互作用する液滴保持器（図3Bおよび図7に示す）の特定の孔を表わす対応番号を施すことにより試薬の取扱いを容易にする。

【0064】次いで、ブラケットと水平な棒482およびアーム476とのかみ合わせによりスライドアセンブリが保持され整合される（垂直方向および水平方向に）まで、アーム476の傾斜した部分478に沿って、水平な棒482の幅をもつブラケット中へ下降させる。この時点で機械はアセンブリを後記のように一連のステーションに導通することができる。あるいはホルダーの水平な棒482を手動によりかみ合わせ、これにより前進させることもできる。

【0065】図6は本発明を実施するための自動化されたシステムの内部の平面図を示す。これはフィッシャー86カタログ（フィッシャー・サイエンティフィック、1985年）の426頁に示されたヒスト・マチック（HISTOMATIC、登録商標）スライドステイナー（172型）の内部と類似し、これを本発明の実施のために改造したものである。

【0066】図6は完全に組立てられた図5のスライド配列を後記のように連続操作により浸漬しうるステーションの配列を示す。ステーション1〜6（数字501〜506）は、この配列様式の場合、ヒストマチック・スライドステイナー、172型（115V、60Hz変型）についてこれまで用いられている一般型の染色容器を含む。フィッシャー86カタログ、426〜27頁（フィッシャー・サイエンティフィック、1985年）を参照されたい。各容器は液体（キシレン、エタノール、エタノール/水混合物、または蒸留水、図面に示す）のプールを保有し、上部断面積は図5の各スライド対の下端の配列よりも大きい。このような幾何学的形状により、この配列が容器のへりに打ち当たることなく各プールと接触しうる。同様にステーション8（数字508）、10（数字510）、12（数字512）および17（数字517）は後記の組成の染色容器を含む。

【0067】ステーション7（数字507）は標準的な電熱器により37℃±5℃に維持され（後記のように閉じたのち）、室内のスライド配列の最下水平面が達する高さよりも下方に水のプールが置かれているため水蒸気で飽和されている湿潤室である。この湿潤室の上部は図5のスライド配列よりも大きく、ただし図5のフランジ451よりも小さな水平寸法をもつ（長方形または正方形）。従ってステーション8（数字507）の湿潤室内

へ図5のスライド配列450を下降させると、フランジ451(図5に示す)が湿潤室の閉鎖を完結する。

【0068】ステーション9および11は、スライド配列を適宜なステーション中へ下降させたときスライド配列の下部空隙(図2Dの42a参照)が同時に接触するのに十分な高さでありかつ水平である上面を備えた乾燥用プロッター(吸収材料)、たとえば紙、木綿または超吸収性のガーゼパッドを含む。この場合、スライド配列がプロッター材料を短距離だけ押し下げてもよい。

【0069】ステーション13, 14, 15および16(数字513, 514, 515および516)は図3Aおよび3Bの素子62および64と同様な液滴保持器を含む。ただし孔および液滴は10個ずつ2重の3列に配列されている。たとえばステーション13(数字513)においては、スライド10枚の最上列は図3Aおよび3Bに示した液滴68a~68eおよび69a~69eについて述べたと同様な様式で、同時に液滴468a~468jおよび469a~469jと接触するであろう。液滴468kおよび469kで始まる第2の2重列には第2列のスライド10対の下部空隙が同時に接触するであろう。液滴468uおよび469uで始まり、液滴468ddおよび469ddで終わる第3の2重列には、スライド対配列がステーション13(数字513)に下降したとき第3列のスライド10対が同時に接触するであろう。

【0070】同様にステーション14(数字514)、15(数字515)および16(数字516)は、それぞれ液滴10個の2重の3列(各ステーションに60個の液滴)を正確な配列で保有する液滴保持器をそれぞれ含む。図6の下列はステーション14の場合は液滴569u~569dd、ステーション15の場合は669u~669dd、ステーション16の場合は769u~769ddと表示される。ステーション18は図6に示した配列の場合、空である。追加の処理工程を希望する場合、これは他の上記のステーションと同様に適宜、染色容器、液滴保持器、または温度浴を含むことができる。

【0071】洗浄器519はヒストマチック・スライドステイナー172型と共に供給される、スライド配列洗浄用の標準ユニットである。これは1回貫流式のリンス液、または再循環式の処理液を備えている。後者の様式が一般に本発明に採用される。実際に作動する際、このユニットはソレノイドにより改造され、スライド配列が洗浄器内にある場合にのみリンス液の再循環流を供給し、機械が貫流式で操作される場合のように連続排液される代わりに排液を行わない。乾燥器520は本発明においては一般に使用されないステーションである(プロ

を用いるため)が、存在することが好ましく、これにより上記の172型スライドステイナーと共に市販される標準40区画スライドホルダーを用いた場合、垂直に広がり、他から0.5mm以上の距離(たとえば2.0mm)分離して配列されたスライドの通常の染色にもこの機器を使用しうる。

【0072】本発明の融通性は、すべての染色容器、液滴保持器、および湿潤室を完全に取り除き、使用者の自由裁量で交換できるという事実により示される。従って、たとえばステーション13, 14, 15および16(図6の数字513, 514, 515, 516)は機器の作動中ですら容易に、すべてのスライド対アセンブリを等しい試薬で処理するための浅い共通試薬のトレート、またはこれらを排液するための追加のプロッターと、またはこれらをインキュベートするための湿潤室と交換することができる。本方法の融通性はさらに、組織切片を抗体に対する抗原部位に関連するもので染色するための下記の具体的方法により示される。下記の染色法のログは前記の図6中の数字を示す。ログに続いて個々の工程数種についての考察、および下記の3種の異なるタグを使用するためにこの手順をいかに変化させるかについての考察を示す: アビジン-ビオチン化ワサビ(horseradish)パーオキシダーゼ複合体、ヤギ抗マウス抗体に結合したアルカリホスファターゼ、ならびに初期プローブとして一次ビオチン化ヘテロ二次抗体、未標準単クローン抗体、またはビオチンに結合したDNAもしくはRNA鎖[ワード、ワイルドロップおよびラングナーの欧州特許出願第63, 879号(1982年11月3日、米国特許出願第255, 223号に基づく)、あるいはワード、リーリイおよびブリガティの国際特許出願84/04970号(1984年12月20日、米国特許出願第503, 298号に基づく)による; 両出願ともエール大学に譲渡] 米国化学アカデミー会報(Proc. Nat. Acad. Sci.) 80巻、4045-49頁(1983年); バイロロジー、126巻、32-36頁(1983年)も参照されたい。

【0073】染色の手順は、ホルマリン固定されたのちろくに包埋された組織塊から切り取られた薄い(たとえば厚さ5μm)組織切片[たとえばヒストマチック266MP型組織処理装置(フィッシャー・サイエンティフィック)(米国特許第4, 141, 312号、ラウダー、1979年2月27日発行)による]から始まる。各工程を以下に番号、ステーション(および図6中に対応する数字)、時間、および溶液もしくは他の処理により記述する。

【0074】

工程	ステーション (図6の数字)	時間 (分)	溶液または他の処理
1A	1(501)	1.0	キシレン

17

18

1B	9 (509)	0.6*	吸取り
2A	1 (501)	1.0	キシレン
2B	9 (509)	0.6*	吸取り
3A	1 (501)	1.0	キシレン
3B	9 (509)	0.6*	吸取り
4A	2 (502)	0.6	キシレン
17B	7 (507)	60	37℃湿潤室
17C	9 (509)	0.6*	吸取り
18A	R (519)	2.0	緩衝液
18B	11 (511)	0.6*	吸取り
19A	R (519)	1.0	緩衝液
19B	11 (511)	0.6*	吸取り
20A	16 (516)	0.6	アビジン&ビオチン-アルカリホス ファターゼ複合体
20B	7 (507)	10	37℃湿潤室
20C	9 (509)	0.6*	吸取り
21A	R (519)	0.6	緩衝液
21B	11 (511)	0.6*	吸取り
22A	R (519)	2.0	緩衝液
22B	11 (511)	0.6*	吸取り
23A	17 (517)	0.6	BCIP&INT (酵素試薬)
23B	11 (511)	0.6*	吸取り
24A	17 (517)	0.6	BCIP&INT
24B	7 (507)	10	37℃湿潤室
24C	9 (509)	0.6*	吸取り
25A	17 (517)	0.6	BCIP&INT
25B	7 (507)	10	37℃湿潤室
25C	9 (509)	0.6*	吸取り
26A	R (519)	2.0	緩衝液
26B	11 (511)	0.6*	吸取り
27A	8 (508)	6.0*	(ヘマトキシリン染色ハリス)
27B	9 (509)	0.6*	吸取り
28A	10 (510)	0.6	トライトンX-100 (0.01%) (蒸留水中)
28B	9 (509)	0.6*	吸取り
29A	12 (512)	0.1	酸アルコール (ヘマトキシリンを分 別する)
29B	11 (511)	0.6*	吸取り
30A	R (519)	2.0	緩衝液 (ブルーヘマトキシリンpH 7.5)
30B	11 (511)	0.6*	吸取り
31	6 (506)	0.6	トライトンX-100 (蒸留水中)
4B	9 (509)	0.6*	吸取り
5A	3 (503)	0.2	試薬用アルコールまたは無水アルコ ール
5B	9 (509)	0.6*	吸取り
6A	3 (503)	0.2	試薬用アルコールまたは無水アルコ ール
6B	9 (509)	0.6*	吸取り
7A	4 (504)	0.6	95%エタノール

7 B	9 (509)	0.6 *	吸取り
8 A	12 (512)	5.0	酸アルコール
8 B	9 (509)	0.6 *	吸取り
9 A	5 (505)	0.2	30%エタノール
9 B	11 (511)	0.6 *	吸取り
10 A	6 (506)	0.2	トライトン (Triton TM) X-100 (0.1%) (蒸留水中)
10 B	11 (511)	0.6 *	吸取り
11 A	6 (506)	0.2	トライトンX-100 (0.1%) (蒸留水中)
11 B	11 (511)	0.2	吸取り
12 A	R (519)	1.0	緩衝液 (0.1M トリスHCl, 0.1M NaCl, pH7.5, 0.01% トライトンX-100) (再循環式)
12 B	11 (511)	0.6 *	吸取り
13 A**	13 (513)	0.6	酵素消化液
13 B**	7 (507)	2.0	37℃ 湿潤室
13 C**	9 (509)	0.6 *	吸取り
14 A**	R (519)	2.0	緩衝液
14 B**	11 (511)	0.6 *	吸取り
15 A	14 (514)	0.6	0.25%ゼラチン (0.1M トリス HCl, 0.1M NaCl, pH7.5中)
15 B	7 (507)	2.0	37℃ 湿潤室
15 C	9 (509)	0.6 *	吸取り
16 A	R (519)	0.6	緩衝液
16 B	11 (511)	0.6 *	吸取り
17 A	15 (515)	0.6	(ビオチン標識) 一次抗体

* 指示した吸取り工程それぞれにつき、機械の制限により0.6分(36秒)を用いた。再プログラミンにより大部分の吸取り工程は12~18秒に短縮されるであろう。

【0075】**工程13A-14Bは、組織の目的抗原部位を露出するために蛋白質消化工程(たとえばプロナーゼ、トリプシンまたはペプシンによる;それぞれ適宜な緩衝液および補助因子を用いる)が必要とされる方法にのみ必要である。薄い組織試料を用いる作業にはこの種の工程は一般に必要なく、従ってこれらの工程を省略し、ステーション13の液滴保持器の代わりに0.1M トリスHCl (pH7.6) および0.1M・NaCl中の1%ウシ血清アルブミンを保有する平たい槽と交換した。

【0076】上記の処理全体を考えると、工程1~7および9~12はワックスを除去し、緩衝化された水性媒質に変換するものである。凍結試料が薄い試料にスライスされている場合、工程1~7および9は不必要である(ワックスは存在しないから)。界面活性剤が工程10, 11および12に含まれ、比較的粘稠な液体の毛管流が生じるのを容易にする。工程8は組織の内生アルカ

30 リホスファターゼ活性を遮断するために採用される。他の酵素を用いる場合(すなわち工程20で)、異なる内生酵素遮断処理が採用されるであろう。工程20で酵素としてパーオキシダーゼを用いる場合、過酸化水素0.9%を含む無水メタノールが工程8のためのステーション18における溶液として用いられるであろう。ステーション12の酸アルコールはなお工程29で用いられるであろう。凍結切片を処理するためには、スライドをまず冷アセトン中で10分間固定し、次いで蒸留水中の0.01% トライトンX-100に0.6分間浸漬し(ステーション10); 0.6分間吸取り(ステーション11)、酸アルコールで処理して内生アルカリホスファターゼ酵素活性を遮断し(ステーション12)、次いで工程13に始まる上記の残りの染色プログラムを行う。

40 【0077】前記の工程13および14組織内の自動抗原の大部分にとって不必要であるが、到達困難な抗原性マーカー、たとえば組織結合性イムノグロブリン、セラチン、ウイルス性抗原たとえばサイトメガロウイルス、アデノウイルスおよび肝炎Bウイルスの表面抗原および50 コア抗原に、ならびに核酸プローブを用いる方法には採

用されるであろう。

【0078】工程15は一般蛋白質を大部分の組織検体に見出される非特異性蛋白質結合部位に付着させるものである。これらの部位を遮断させないと、工程17および20において一次抗体またはアビジンもしくはビオチン-酵素複合体の非特異的付着による望ましくないバックグラウンド水準を与えるであろう。工程20において二次抗体（たとえば一次抗体が未標識マウス単クローン抗体である場合、アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗マウス免疫グロブリン抗体）をアビジン-ビオチンアルカリホスファターゼ複合体の代わりに用いる場合、工程15における非特異性蛋白質、たとえばゼラチンの遮断作用は二次抗体の非特異性結合を排除するのには不十分であろう。従って工程20で用いられる二次抗体と同一種の正常（感作されていない）血清（すなわち前記の場合は感作されていないヤギ血清）を用いることができる。DNAプローブの作業には非特異性DNAおよび蛋白質を工程15に施すことが望ましいであろう。

【0079】工程17は目的とする抗原部位を標的とするために用いられる一次抗体を提供する。一般にこれはビオチン標識されているが、二次抗体を工程20で用いる場合は未標識抗体を工程17で用いてもよい。あるいは一次抗体が放射性標識または蛍光標識されていてもよい。適切な前処理工程が行われるならば、DNAまたはRNAプローブ（たとえばビオチン標識されたもの）を工程17に用いることもできる。このような場合、これらを施したのち、スライドアセンブリを変性するのに十分なほど高い温度（例えば100℃）の室内に数分間入れたのちハイブリッド再形成のために37℃の湿潤室（工程17B）に入れるべきである。上記の方法において工程18および19で表わされる洗浄工程は、回数および期間、ならびにDNAプローブ用液体の種類を著しく拡大することができる。たとえば米国特許第4,533,628号明細書（マス、1985年8月6日）およびそこに引用された参考文献を参照されたい。

【0080】工程20は前記のように一次抗体に化学的に結合したビオチンを検出試薬（たとえば四価卵白結合性蛋白質であるアビジンによる酵素）に化学的に結合した第2ビオチン部分に架橋させるものである。アビジン（ベクター・ラブズからの卵白アビジンはその安定性が良好であるため、ストレプトアビジンよりも使用される。適切な前処理を行うならば、他のビオチン標識された検出系たとえばワサビペーオキシダーゼ（HRP）またはβ-ガラクトシダーゼとビオチンの結合体も使用できる。HRPはアルカリホスファターゼを用いて得られる発色性の酵素反応生成物〔たとえば3-ブロム-4-クロル-5-インドリルホスフェート（BCIP）およびインドニトロテトラゾリウム（INT）もしくはニトロブルーテトラゾリウム（NBT）〕よりも確実に組織内で結合する発色性の酵素反応生成物（たとえばジアミ

ノベンジジンテトラ塩酸塩の重合生成物）を形成するという利点をもつ。アルカリホスファターゼ発色体の付着はステーション6および10でトライトンX-100を除き、機器を直接に他の2回の蒸留水中でのリンスサイクルへ進めることにより高められる（ステーション10およびこれに続く吸取りステーション11）。次いでアンモニア水の浅いトレイを入れたステーション18へスライドを移す。次いでスライドを0.1MトリスHCl（pH7.5）および0.1M・NaCl中400mg/mlでポリビニルピロリドン（PVP-40）に直接に固定する。しかしHRPは工程23～25で必要となる酵素反応体が光に対して不安定であり、発癌性をもつ疑いがあるという欠点をもつ。従って、HRPを用いる場合は新鮮な試薬を調製してステーション17に入れるまでプログラムを工程21または22で停止することが好ましい。次いでプログラムを手動により再開する。この時間は工程24Bおよび25Bのインキュベーション時間を短縮することにより補償される。さらにこの酵素反応生成物はスライドを工程31ののちステーション6,5,4,3および2へと戻し（工程1～7および9の逆の順序）、その際幾つかのステーションで多数回接触させ、各接触ののち吸取るのに十分なほど不溶性である。得られた染色試料を次いでキシレンで被覆すると、たとえばパーマウント（Permunt、登録商標）マウンド剤でドライマウントできる状態になる。

【0081】あるいは工程20で蛍光性タグ、たとえばアビジン-フルオレセイン結合体を用いることもできる。この場合、工程23～26は不必要である。

【0082】工程23～25は工程20で導入された酵素タグ（アルカリホスファターゼ）と共に不溶性発色体を生成するのに適した酵素試薬（BCIP+INT）を供給する。工程27,29および30は、標識抗原部位が見出される組織を核視覚化（nuclear visualization）するための対比染色（counterstain）としてのヘマキシリンを施し、発色させる工程である。

【0083】上記の方法において工程17および20は特に高価な試薬を用いるので、それぞれステーション15および16で液滴保持器を用いて行う。このような液滴保持器は、すべての液滴が同一であってもこれらの試薬を控え目に使うために普通に用いられ、これによりすべての試料がこの工程で同等に処理される。しかし多くの場合、特にステーション15の一次抗体に関して、これらの液滴保持器で個別化する必要がある。図7に示す一部充填された液滴保持器は、異なる液体を希望するいかなる様式でも液滴として施すのが可能であることを示す。

【0084】水平に広がる硬質の底板462が水平に広がる弾性因子464を与える。60個の孔が員子464全体に10個の2重3列に設けられている。

【0085】第1の2重列は第1処理液の液滴20個で満たされている(468a, 468j, 469aおよび469jを含む)。第2および第3の2重列の孔(466k, 466t, 466uおよび466ddを含む)は空である。これらを所望により第2および第3の処理液で満たし、第1列の液滴が第1列のスライド対に施される間に異なるスライド対に施されてもよい。

【0086】工程13で酵素消化を採用する場合、液滴保持器をステーション13(図6の513)にも使用できる。この工程での個別化は、この時点で消化の様式または程度を変えたい場合に採用できる(たとえばある液滴はペプシン不含の緩衝液、あるものはペプシン含有緩衝液である)。同様に工程15において、ステーション14でゼラチンよりも高価な遮断剤を用いる場合、または遮断の様式が可変であることを希望する場合、ステーション14に液滴保持器が用いられるであろう。

【0087】ステーション8および17はトレーとして示されているが、工程23~25および27においても個別化するために液滴保持器を採用してもよい。適切なスライドおよび検体が得られるならば、等しい試料のレプリカを形成するために酵素が発現する染色および対比染色の異なる色彩水準を達成し、これにより、選択すべきものとコントラストをなす一定範囲の水準を生じることが望ましいであろう。

【0088】中程度に高価な処理液(たとえばヘマトキシリン染色)を施すためにトレーを用いる工程に関しても、本発明はジョンソンらのシステム(75mm×25mmの毛管空間の大部分を満たす)よりも少量の液体を用いる。本発明方法の場合、一部(約30~40mm×25mm)が満たされるにすぎないからである。さらに、排液は回転よりもむしろ吸取りによって著しく容易に行われる。

【0089】全体の処理期間中にスライド間隙から排液されるべき各種液体をすべて吸取るために十分な吸収容量をもつ吸収材料を使用し、かつこれに十分な数の吸収材料ステーション(図6においてステーション9(509)および11(511))を採用することが好ましい。あるいは本方法の適宜な時点(たとえば工程17Bにおいて)各吸収材料を新たな吸収材料と交換するか(ステーション9および11);あるいは1か所の吸収材料ステーションが使用されている間に(たとえば工程9B~14Bにおいてステーション11)、他方のステーション(ステーション9)の吸収材料を交換してもよい。

【0090】本発明の好ましい形態においては、2表面間の間隙が垂直位置に維持され、分離されたアリコート液体試薬が対向する2表面(たとえば2枚の顕微鏡用ガラススライド)の下縁間に生じた空隙接触し、毛管作用により上方へ流動し、間隙の内面を覆う。処理後に上記空隙のいずれかの地点を吸収材料と接触させることに

より、液体試薬を平面の間から排除することができる。このような方法は多数の固定化された試料を一連の液体試薬で処理することを伴い、かつ液体試薬を順次施し、そして同一の被分析体をその方法における次の液体試薬に暴露する前に、試料である被分析体から液体試薬を排除する必要がある複雑な処理の管理を能率化するのに特に有用である。これは、貴重な、または有害な、または高価な液体試薬、たとえば溶存したタグ付きもしくはタグなしの抗体、核酸プローブ、放射性物質、またはヒトとの接触を最小限にすることが望ましい、生物災害をもたらす材料を最小量用いることが望まれる場合に特に有用である。

【0091】平行な表面(従ってそれらの間の間隙)が垂直でなく、上方へ傾斜しているか、または水平に広がっている、本発明の他の形態がある。このような場合それぞれ、間隙の適宜な縁に、分離されたアリコートの処理液(個別化可能である)が接触すること、または毛管作用により間隙から液体を排除すること(たとえば間隙の縁に吸収材料が接触することにより、各液体の急速排除を伴う多工程処理が可能となる)、あるいはこれら両者に起因する本発明の利点は、前記の各形態と同様に得られる。同様に、実質的に平行な表面である必要はなく、たとえば円筒形または円錐形の断片の場合のように彎曲していてもよい。

【0092】本発明の垂直および水平の形態は双方とも、現在別個の抗原情報または遺伝情報の分析を個々の手動操作により行っている臨床試験所および研究所でルーチンに行われている手動染色法による先行技術と同じ用途、ならびにそれらにまさる利点をもつ。これらの用途には下記のものが含まれるが、これらに限定されるものではない。固体表面、たとえば顕微鏡用ガラススライド、ニトロセルロース、もしくは酢酸セルロースメンブランフィルター、または平らな有機可塑性(organoplastic)支持体に固定化された、ヒト、植物、または動物組織、細胞スミア、または抽出物において診断および予報上重要な抗原の検出。これらの用途にはさらに、一致するヒト、植物または動物の組織および組織抽出物を、それらの特異的遺伝子に対する核酸ハイブリッド形成法およびそれらのRNA転写によりスクリーニングすることが含まれる。これらの方法は実験室で1個の組織を数種の異なる組織化学的マーカーにつき染色する特殊な染色法、たとえばムシカルミン(mucicarmin)、銀、グラム、ギムザ、パパンニコローその他の組織学的、または血液学的、または細胞学的染色にも用いられる。

【0093】あるいは多数の異なる解剖部位および異なる種から得た組織を、特に用いる試薬が高価であるかまたはわずかに μ lの量で得られる場合、単一系列の試薬で染色することができる。制限された上清または腹水から直接得られた単クローン抗体を用いる単一組織型のス

クリーニングとしてのこの種のシステムの体積要件が低いことが、平面上に固定化された薄い試料を垂直または水平位の毛管流を用いて処理するためにデザインされた方法および装置にとって理想的な利用法である。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1Aは第1の形態によるスライドアセンブリの側方立面図である。図1Bは図1Aの線1B-1Bに沿って得た前方立面図である。図1Cは図1Aの線1C-1Cに沿って切断して得た前方立面図である。

【図2】図2Aは第2の形態によるスライド対を分解した状態の側方立面図である。図2Bは図2Aと同じスライド対をホルダー部分内で組立ててスライドアセンブリを構成した状態の、図2Aと同じ立面図である。図2Cは図2Bの線2C-2Cに沿って切断して得た、ホルダー内のスライドアセンブリの上面図である。図2Dは第3の形態によるスライドアセンブリの分解した状態を示す、図2Bと同様な図である。図2Eはホルダー内に入れられた図2Dのスライドアセンブリの、図2Bと同様な図である。

【図3】図3Aは液滴保持器の上方に置かれた、それぞれ本発明の第2の形態によるスライドアセンブリの配列を、図3Bの3A-3Aに沿って切断して得た側方立面図である。図3Bは図3Aの線3B-3Bに沿って得た、図3Aに断面で示した液滴保持器の平面図である。図3Cは図3Aと同じ角度からみた、液滴1個の接触している1個のスライドアセンブリの拡大図であり、液体が本発明方法に従い毛管流によって狭い間隙内へ垂直方向に引込まれる状態を示す。図3Dは液体が毛管流によって狭い間隙から吸収材料中へ垂直方向に引込まれる状態を示す、図3Cと同様な図である。

【図4】図4は第4の形態によるスライドアセンブリを示す、図1Cと同様な前方立面図（断面）である。

【図5】図5は一部スライド対が装填された、第5の形態によるスライドホルダーの倒立した状態を示す透視図であり、配列が5対のスライド5列ではなく10対のスライド3列であるという点のみにおいて図2A、2B、3A、3B、3Cおよび3Dに示した形態と異なる。

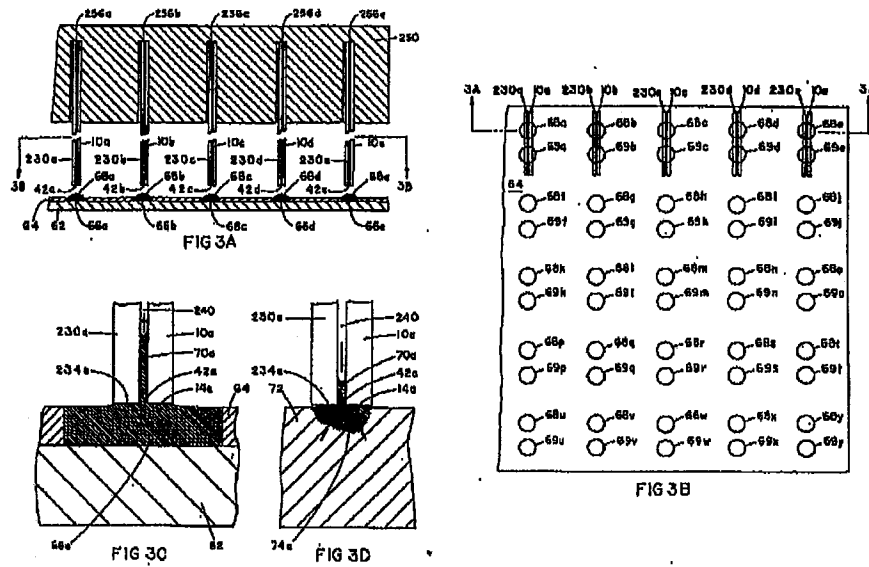
【図6】図6は図5のスライド対配列を用いた手動または自動多段階法用のステーションの配列を示す平面図である。

【図7】図7は図5および図6の形態による液滴保持器が一部装填された状態を示す透視図である。これらの図面において各記号は下記のものを表わす。

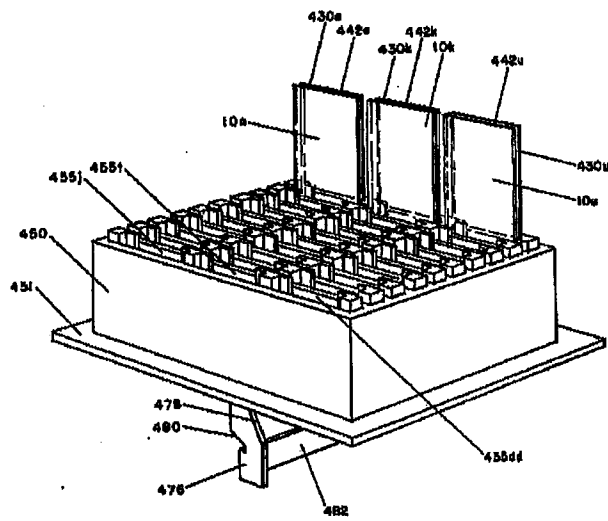
【符号の説明】

- 10 : 試料保持スライド
- 12 : 10の前面
- 14 : 10の下端
- 16 : 10の裏面
- 18 : 10の上端
- 20 (120', 320) : 試料
- 22 (122, 122', 322, 322') : シム
- 24 (124), 26 (126) : シムの粘着面
- 30 (130, 230, 430) : 対面スライド
- 32 (132, 132') : 30 (130, 130') の前面 (対向平面)
- 34 (134, 234,) : 30 (130, 230) の下端
- 36 (136) : 30 (130) の裏面
- 38 (138) : 30 (130) の上端
- 40 (240) : スライド間隙
- 42 : 40の下端
- 44 (144) : シムの下端
- 146, 148, 146', 148' : プロデュバランス
- 150 (150', 250, 450) : スライドホルダー
- 152 : 150の下開きスロット
- 156 (256) : 150 (250) の整合面
- 62 (462) : 液滴保持器の支持体
- 64 (464) : 液滴保持器の弾性員子
- 66 (466) : 孔
- 66, 69 (468, 469, 568, 569, 668, 669, 768, 769) : 液滴
- 70 : 毛管
- 72 : 吸収材料
- 74 : 液体前面
- 312 : 試料保持スライドの前面 (シムで被覆されていない)
- 314 : 試料保持スライドの下端
- 442 : スライド間隙下端
- 451 : スライドホルダー上部プレート
- 455 : スロット
- 476 : アーム
- 478, 480 : アームの傾斜部
- 482 : 水平な棒

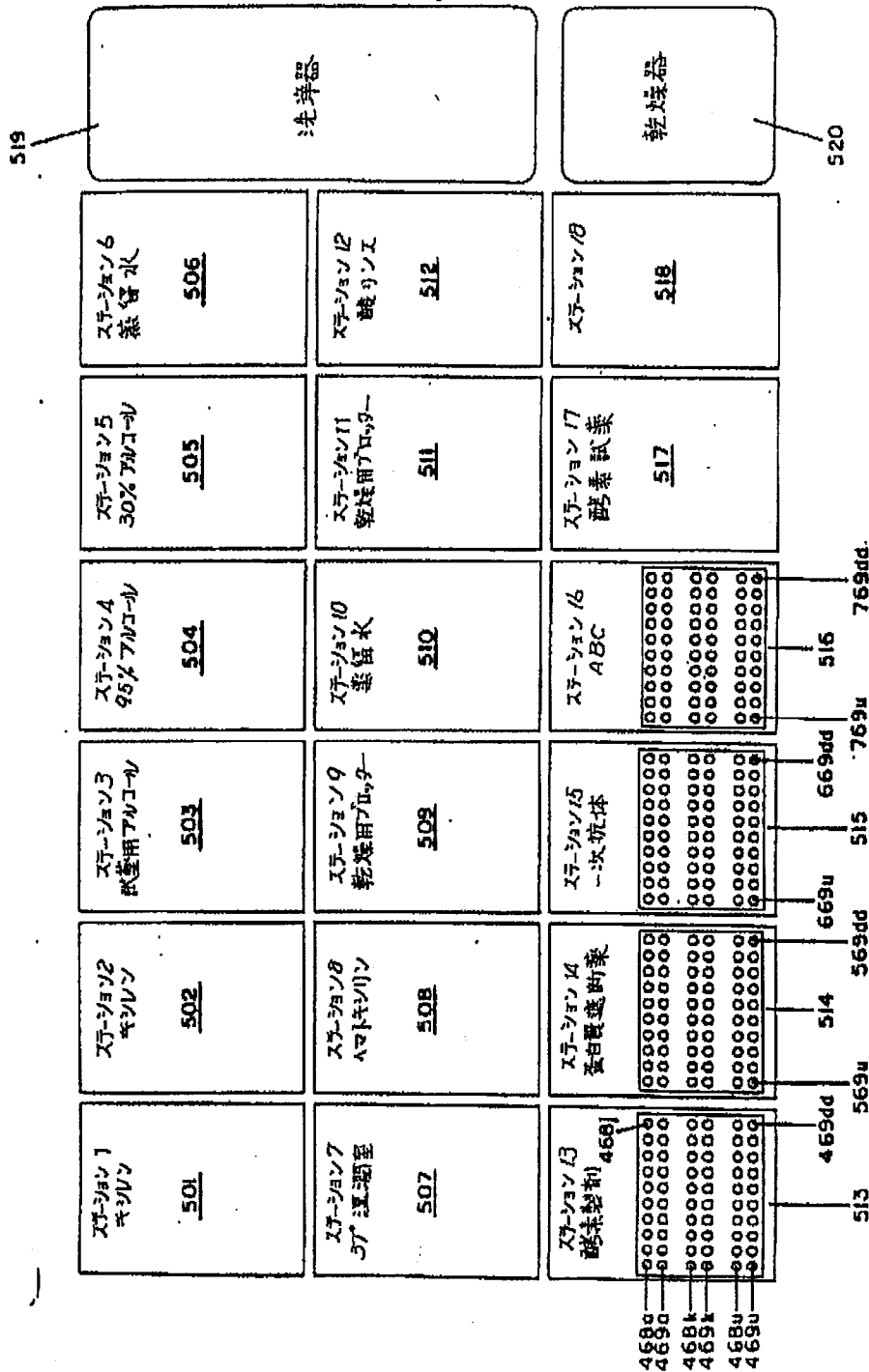
【図3】



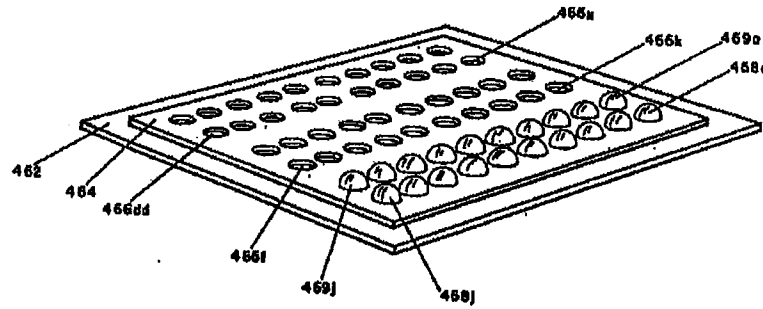
【図5】



【図6】



【図 7】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶

G 0 1 N 33/543

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

R 7906-2 J

P 7906-2 J